文章编号:1000-5404(2010)11-1207-03

论著

葡萄糖转运蛋白-2逆转录病毒表达载体构建/包装及其鉴定

方 芳,凌贤龙 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[摘要] **目的** 构建葡萄糖转运蛋白-2(glucose transporter-2,GLUT-2)基因逆转录病毒表达载体及其稳定产毒细胞系,为新型"人工胰岛β细胞"的构建奠定基础。**方法** 质粒pCB7/GLUT2经*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切,克隆至逆转录病毒载体PLXSN,构建成重组逆转录病毒表达载体pL-GLUT2-SN,经酶切及测序鉴定;转pL-GLUT2-SN至包装细胞系PA317,G418抗性筛选,检测上清病毒滴度,挑选滴度较高的稳定产毒细胞克隆行PCR及RT-PCR鉴定。**结果** 建立GLUT-2基因逆转录病毒表达载体pL-GLUT2-SN,经酶切及测序证实目的基因插入位点及读码框架正确;所建稳定产毒细胞克隆PA317/GLUT2,其最高病毒滴度达7.1×10^5 CFU/ml,PCR及RT-PCR证实GLUT-2基因整合入其中并稳定表达。**结论** 成功构建GLUT-2基因逆转录病毒表达载体及其稳定产毒细胞系,为"人工胰岛β细胞"的构建奠定了基础。

[关键词] 葡萄糖转运蛋白-2;逆转录病毒载体;PA317细胞;包装;鉴定
[中图法分类号] R394-33; R394.3 **[文献标志码]** A

Construction of retrovirus expression vector containing GLUT-2 gene and its identification

Fang Fang, Ling Xianlong (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To establish the retrovirus expression vector containing glucose transporter-2 (GLUT-2) gene and its stable virus producing cell line, for the construction of new "artificial islet beta cells". **Methods** Plasmid pCB7/GLUT2 was digested by *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ and cloned to retroviral vector PLXSN for the construction of recombinant plasmid pL-GLUT2-SN, which was identified by enzyme digestion and sequencing, and then transfected to packaging cell line PA317. Titer of the recombinant virus was detected. Cell lines with a high titer were cloned and identified by PCR and RT-PCR. **Results** The retrovirus expression vector pL-GLUT2-SN was established, in which the insertion site and reading frame of target gene were confirmed by enzyme digestion and sequence analysis. The highest titer of virus producing cell line PA317/GLUT2 was 7.1×10^5 CFU/mL. PCR and RT-PCR showed that the GLUT-2 gene was integrated into PA317/GLUT2 and stably expressed. **Conclusion** A retrovirus expression vector containing GLUT-2 gene and its stable virus producing cell line PA317/GLUT2 are successfully constructed, thus laying a foundation for the construction of "artificial islet beta cells".

[Key words] glucose transporter-2; retroviral vector; PA317 cell; packaging; identification

Corresponding author: Ling Xianlong, Tel: 86-23-68774604; E-mail: xllin@mail.xqhospital.com.cn

糖尿病以胰岛素绝对或相对缺乏导致各种代谢紊乱为主要特征,其病因尚未完全阐明。传统的体外胰岛素注射治疗,由于与胰岛素分泌的生理模式不符,易致血糖波动而引起相关并发症。细胞移植治疗虽为研究热点,但胰岛β细胞分离与储存技术难度较大、代价昂贵,因此寻找新的移植细胞来源是该研究亟待解决的关键难题。近年有研究者致力于体外构建模拟正常胰岛β细胞功能的基因工程细胞系,即"人工胰岛β细胞"[1,2]。葡萄糖转运蛋白-2(Glucose Transporter-2, GLUT-2)是调节胰岛素释放的葡萄糖传感器,其活性直接或间接受血糖浓度调节,从而改变葡萄糖在胰岛β细胞内的代谢速率,进而调节胰岛素分泌[3,4]。因此,本研究构建GLUT-2基因逆转录病毒表达载体及

[通信作者] 凌贤龙,电话:(023)68774604,E-mail:xllin@mail.xqhospital.com.cn

其稳定产毒细胞系,为新型"人工胰岛β细胞"的构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒pcB7/GLUT2购自BetaGene Inc(Dallas,Texa,USA),pLXSN购自美国Clontech公司、PA317细胞购自中科院上海细胞生物所;脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ购自华美生物工程公司;T_4 DNA连接酶购自宝生物(大连)公司;Ploybrene购自sigma公司;FBS购自Gibco公司;质粒抽提及回收试剂盒购自上海品美公司。

1.2 方法

1.2.1 重组逆转录病毒载体构建 质粒pcB7/GLUT2与逆转录病毒载体pLXSN分别以*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切,切胶回收GLUT-2 cDNA与pLXSN线性载体片段,连接、转化,提取质粒作酶切与测序鉴定。

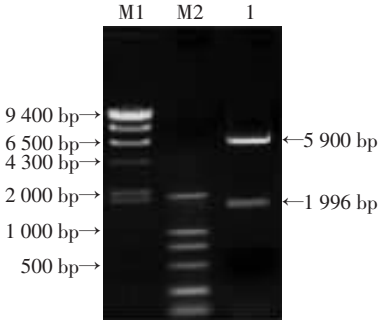
1.2.2 pL-GLUT2-SN包装与滴度测定 Lipofectamine2000介导pL-GLUT2-SN转包装细胞PA317,以空载体pLXSN转染细胞作对照;经G418(1 mg/ml)筛选,直至肉眼可见抗性细胞克隆形成,挑取分隔良好的细胞克隆扩大培养;更换普通DMEM培养基,收集抗性细胞克隆上清感染NIH3T3细胞,测病毒滴度,留取滴度较高的产毒细胞克隆及病毒原液备用。

1.2.3 产毒细胞克隆PA317/GLUT2鉴定 分别提取PA317/GLUT2与PA317/pLXSN细胞的基因组DNA及总RNA,以GLUT-2基因特异引物行PCR及RT-PCR鉴定,引物序列如下:上游5′-CCAGCCTGTGTATGCAACCATC- 3′;下游5′-ACCAGTCCCAGCGACATGAAG-3′。

2 结果

2.1 GLUT-2基因重组酶切及测序鉴定

重组逆转录病毒载体pL-GLUT2-SN经*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切,获得1 996 bp的GLUT-2 cDNA及5.9 kb的线性载体片段pLXSN,证实GLUT-2 cDNA插入载体pLXSN中且插入位点正确(图1);目的基因测序证实其序列与文献[5]中GLUT-2 cDNA序列相同。



M1:λ-*Hind*Ⅲ;M2:DL2000标准;1:pL-GLUT2-SN/ *Eco*RⅠ+*Bam*HⅠ

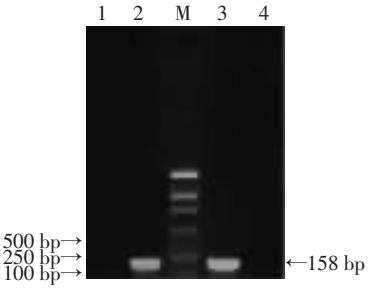
图1 pL-GLUT2-SN酶切鉴定

2.2 病毒滴度测定

用PA317/GLUT2病毒上清感染NIH3T3细胞,约14 d可见抗性细胞克隆形成,平均病毒滴度为6.4×10^5 CFU/ml,最高病毒滴度为7.1×10^5 CFU/ml,分别为3.2×10^5、7.1×10^5、4.1×10^5、5.0×10^5、1.4×10^5、5.8×10^5、1.9×10^5、2.3×10^5、1.8×10^5、4.6×10^5 CFU/ml,平均病毒滴度为6.4×10^5 CFU/ml,最高病毒滴度为7.1×10^5 CFU/ml。

2.3 产毒细胞克隆鉴定

PA317/GLUT2细胞PCR及RT-PCR产物电泳均出现约158 bp的目的条带,而PA317/pLXSN细胞PCR及RT-PCR产物电泳均无目的条带出现,证明PA317/GLUT2细胞中已有GLUT-2基因的整合与转录(图2)。



1:PA317/pLXSN的PCR;2:PA317/GLUT-2的PCR;M:标准;3:PA317/GLUT-2的RT-PCR;4:PA317/pLXSN的RT-PCR

图2 PA317/GLUT-2细胞PCR及RT-PCR鉴定

3 讨论

胰岛细胞移植治疗糖尿病是目前研究的热点。近年有研究者致力于体外构建模拟正常胰岛β细胞功能的基因工程细胞系,即"人工胰岛β细胞",取得一定成效。

理想的人工胰岛β细胞,必须能实现前胰岛素的合成、加工,成熟胰岛素分泌以及胰岛素的分泌调节[1-4]。在葡萄糖刺激性胰岛素分泌机制研究中研究者发现,GLUT-2是葡萄糖与胰岛素分泌间的传感器。GLUT-2是β细胞表达的主要葡萄糖转运蛋白类型,其活性直接或间接受血糖浓度调节,从而改变葡萄糖在胰岛β细胞内的代谢速率,进而调节胰岛素的分泌[2-8]。有研究发现高糖毒性通过对GLUT-2的下调作用减少葡萄糖刺激的胰岛素分泌;也有研究发现AtT-20ins细胞能表达葡萄糖激酶基因及成熟胰岛素,但不表达GLUT-2,因而其胰岛素分泌对葡萄糖刺激仍缺乏反应;此外,在糖尿病大鼠模型中,β细胞内的GLUT-2活性比正常明显降低[2,4-14]。显然,GLUT-2是葡萄糖与胰岛素分泌偶联机制中的重要节点。

INS-1 细胞是近来较受关注的一种胰岛素分泌细胞[15-18],源于辐射诱导的胰岛 β 细胞瘤,通过在肿瘤细胞培养基中加入 2-巯基乙醇(2-ME)而建立。它自身含有较多的胰岛素分泌颗粒(胰岛素含量约为 8 μg/10^6细胞,超过 80 代仍可保持稳定分泌),能表达葡萄糖激酶,仅 GLUT-2 的表达偏低[19]。并且,该细胞表达氧自由基清除酶较少,因此对氧化应激损伤高度敏感,这与原代培养的胰岛 β 细胞相似。同时其自身不分泌胰高血糖素与生长抑素,更有助于在研究中排除其他因素对胰岛素分泌的干扰[20]。因而 INS-1 细胞是构建"人工胰岛 β 细胞"较理想的靶细胞来源。我们拟通过 GLUT-2 基因转染 INS-1 细胞,构建胰岛素分泌受葡萄糖浓度调节的新型"人工胰岛 β 细胞"。

将目的基因导入靶细胞获得长期稳定表达是构建"人工胰岛 β 细胞"的一个重要环节。选择高效、稳定的转染载体是达到这一目的的关键。病毒载体是真核细胞转染常用的载体,包括腺病毒与逆转录病毒载体。腺病毒载体具有感染效率高、不引起插入突变、易于制备等特点,但不能使靶基因持久稳定表达。逆转录病毒载体可携带靶基因整合至宿主细胞基因组中,从而获得长期稳定表达,但不能转染有丝分裂后的细胞。近期研究发现,一定间隔期的多次重复感染有助于提高基因转染效率:一方面,可通过间歇期清洗掉封闭靶细胞表面结合位点的病毒;另一方面,多次重复感染可保证更多的细胞处于分裂期,从而提高逆转录病毒载体介导的基因转染效率[19]。因此,我们基于此法成功构建了携 GLUT-2 基因的稳定产毒细胞克隆 PA317/GLUT2,其最高病毒滴度达 7.1×10^5 CFU/ml。

参考文献:

[1] 郑宏庭, 邓华聪, 兰丽珍, 等. 稳定表达人胰岛素原突变基因的 HepG2 细胞构建及其胰岛素分泌[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(24): 2361-2363.

[2] Wilson M O, Scougall K T, Ratanamart J, *et al*. Tetracycline-regulated secretion of human (pro) insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(2): 391-403.

[3] Stolarczyk E, Le-Gall M, Even P, *et al*. Loss of sugar detection by GLUT2 affects glucose homeostasis in mice[J]. PLoS ONE, 2007, 2(12): e1288.

[4] Leturque A, Brot-Laroche E, Le-Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 296(5): E985-E992.

[5] Wu L, Fritz J D, Powers A C. Different functional domains of GLUT2 glucose transporter are required for glucose affinity and substrate specificity[J]. Endocrinology, 1998, 139(10): 4205-4212,

[6] 宋晓丹, 左伟勇, 范英兰, 等. 乳源 β-酪啡酞 7 对大鼠葡萄糖吸收的影响及其作用机制[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(19): 1947-1951.

[7] Maassen J A, T-Hart L M, Van-Essen E, *et al*. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation[J]. Diabetes, 2004, 53 Suppl 1: S103-S109.

[8] Stelmanskan E. The important role of GLUT2 in intestinal sugar transport and absorption[J]. Postepy Biochem, 2009, 55(4): 385-387.

[9] Kellett G L, Brot-Laroche E, Mace O J, *et al*. Sugar absorption in intestine: the role of GLUT2[J]. Annu Rev Nutr, 2008, 28: 35-54.

[10] Banzo J, Velilla J, Abos M D, *et al*. Diabetes mellitus and pancreatic tumor[J]. Rev Esp Med Nucl, 2004, 23(1): 33-38.

[11] Andrali S S, Sampley M L, Vanderford N L, *et al*. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells[J]. Biochem J, 2008, 415(1): 1-10.

[12] Lopes-Da-Costa C, Sampaio-De-Freitas M, Sanchez-Moura A. Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats[J]. J Nutr Biochem, 2004, 15(4): 236-241.

[13] Berry G T, Baynes J W, Wells-Knecht K J, *et al*. Elements of diabetic nephropathy in a patient with GLUT 2 deficiency[J]. Mol Genet Metab, 2005, 86(4): 473-477.

[14] Islam M S, Rahman S A, Mirzaei Z, *et al*. Engineered beta-cells secreting dipeptidyl peptidase IV-resistant glucagon-like peptide-1 show enhanced glucose-responsiveness[J]. Life Sci, 2005, 76(11): 1239-1248.

[15] 巩秋红, 娄晋宁, 叶丽亚, 等. 重组人胰高血糖素样肽 1(7-36)促进 INS-1 细胞胰岛素释放与合成[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2004, 20(6): 559-560.

[16] 姜友昭, 张玲, 周艳, 等. 小鼠 PPARδ 腺病毒载体的构建及其在 INS-1 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 68-70.

[17] 姜友昭, 张玲, 郑江, 等. 不同葡萄糖浓度对 INS-1 细胞 PPARδ 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3): 247-249.

[18] 方红娟, 杨金奎. 大鼠 ACE2 腺病毒载体的构建及其在 INS-1 细胞中的表达[J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(4): 449-454.

[19] Choi S E, Lee S M, Lee Y J, *et al*. Protective role of autophagy in palmitate-induced INS-1 beta-cell death[J]. Endocrinology, 2009, 150(1): 126-134.

[20] 郑宏庭, 邓华聪, 蹇锐, 等. 逆转录病毒载体介导胰岛素原基因突变体与葡萄糖激酶基因共转染的应用价值[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(22): 2026-2028.

(**收稿**:2010-03-01;**修回**:2010-03-21)

(编辑 栾 嘉)